Aus der Chirurgischen Abteilung
(Leiter: Prof. Dr. med. Hermann Mathis)
der Poliklinik und Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ewald Harndt)

EINE GEZIELTE PRÄPARATIONSMETHODE ZUR HERSTELLUNG SITUATIONSGLEICHER ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUFNAHMEN VON LICHTMIKROSKOPISCH BESTIMMTEN OBJEKTBEREICHEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1961

vorgelegt von
Wilfried Möckel
aus Siebenbrunn Vogtl.

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Chirurgischen Abteilung
(Leiter: Prof. Dr. med. Hermann Mathis)
der Poliklinik und Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ewald Harndt)

EINE GEZIELTE PRÄPARATIONSMETHODE ZUR HERSTELLUNG SITUATIONSGLEICHER ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUFNAHMEN VON LICHTMIKROSKOPISCH BESTIMMTEN OBJEKTBEREICHEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wilfried Möckel
aus Siebenbrunn Vogtl.

Dekan: Professor Dr. med. Helmut Selbach
Referent: Professor Dr. med. Hermann Mathis
Korreferent: Professor Dr. med. Willy Schwarz

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 2. II. 1961

Meinen lieben Eltern
gewidmet

Disposition

I Einleitung

II Literatur

1. Der Abdruck wird ohne vorherige Markierung direkt gezielt auf die Blende präpariert
2. Aus dem Abdruck wird ein bestimmtes Gebiet ausgestanzt und danach auf die Blende präpariert
3. Auf dem Objekt wird vor der Präparation auf die Blende ein bestimmtes Gebiet begrenzt

III Material und Präparationstechnik

1. Material
2. Allgemeine Präparationstechnik

IV Ergebnisse

A Allgemeines und Problematik

B Versuche zur Anbringung einer geeigneten Markierung

C Versuche zur Übertragung des markiekten Gebietes auf die Blende

D Endgültiges Verfahren zur Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen

1. Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen von lichtmikroskopisch bestimmten Bezirken eines polierten Zahnschliffes
2. Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen von lichtmikroskopisch bestimmten Bezirken eines angeätzten Zahnschliffes
3. Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen von lichtmikroskopisch bestimmten Bezirken eines Zahnbruchs
4. Herstellung gezielter elektronenmikroskopischer Aufnahmen von lichtmikroskopisch ausgewählten Bezirken eines Abdrucks

a) Markierung auf dem vom Zahnbruch genommenen Abdruck
b) Markierung auf dem vom Zahnschliff genommenen Abdruck

V Diskussion

VI Zusammenfassung

VII Literaturverzeichnis

I Einleitung

Durch die Anwendung des Elektronenmikroskops in der Zahnhistologie gelang es in den letzten 15 Jahren, einen umfassenden Einblick in die sublichtmikroskopischen Strukturen der Zahnhartgewebe zu gewinnen. Wie auf fast allen Anwendungsgebieten der Elektronenmikroskopie ergab sich auch hier die Notwendigkeit, den direkten Anschluß an die Lichtmikroskopie zu gewinnen und das Abdruckverfahren dadurch exakter zu gestalten, daß elektronenmikroskopische Aufnahmen von lichtmikroskopisch ausgewählten Objektteilen hergestellt werden können. Bei der bisher üblichen Präparationstechnik der Abdrücke bleibt es mehr oder weniger dem Zufall überlassen, ob es gelingt, engumgrenzte Objektstellen auf die winzige Bohrung der elektronenmikroskopischen Objektträger, den sogenannten Blenden, zu bringen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es daher sein, ein gezieltes Präparationsverfahren zu schaffen, das ohne apparativen Aufwand gestattet, lichtmikroskopisch bestimmte Stellen eines Objektes elektronenmikroskopisch abzubilden, um damit die Möglichkeit zu schaffen, vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an ein und demselben Objekt durchzuführen.

II Literatur

Es wurde schon verschiedentlich der Versuch unternommen, eine gezielte Präparationsmethode zu erarbeiten. Die Durchsicht der Literatur zeigt, daß die Hauptschwierigkeiten zur Verwirklichung des Verfahrens in der Gewinnung eines engumrissenen Ausschnittes aus dem Abdruck bzw. dem Objekt und noch mehr in der Aufbringung der so gewonnenen Ausschnitte auf die Blenden liegen. Die verschiedenen hierfür beschrittenen Wege lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Der Abdruck wird ohne vorherige Markierung direkt gezielt auf die Blende präpariert

BETHGE (2) gibt hierzu folgende Methode an:
Mit Hilfe eines Vakuums wird eine Blende am Objektiv befestigt und unter lichtmikroskopischer Kontrolle die interessierende Stelle des Abdruckfilms eingestellt. Sodann wird durch Federkraft die Blende auf den Abdruck aufgedrückt und mittels eines auf der Blende angebrachten ringförmigen Klebestreifens aufgeleimt. Durch Aufhebung des Vakuums wird die Blende freigegeben. Dieses Verfahren erfordert allerdings eine sehr komplizierte Apparatur und eignet sich nur zur gezielten Untersuchung von Abdrücken.

2. Aus dem Abdruck wird ein bestimmtes Gebiet ausgestanzt und danach auf die Blende präpariert

Unter diesem Punkt lassen sich die Verfahren von BEYERSDORFER (3), KRAUSE (6) und LEONHARD (8) einordnen. Der von diesen Autoren beschrittene Weg besteht darin, daß unter dem Lichtmikroskop der gewünschte Bezirk aus dem Abdruck ausgestanzt und mittels einer Spezialhalterung auf der Blende fixiert wird.

Zu der von BEYERSDORFER (3) angegebenen Methode gehören eine Vorrichtung zum Ausstanzen der Abdrücke sowie eine Auslösevorrichtung, in der die Blenden gelagert werden. Das Verfahren besteht darin, daß unter dem Lichtmikroskop aus dem Polystyrolabdruck ein Stückchen in Größe einer Blende (in dessen Mitte das interessierende Gebiet liegt) ausgestanzt wird. In einer zylinderförmigen Halterung wird das ausgestanzte Stück auf der Blende fixiert und ausgelöst.

KRAUSE (6) gewinnt ähnlich wie BETHGE (2) mit einer am Objektiv eines Lichtmikroskops befestigten Stanzvorrichtung den gewünschten Ausschnitt aus dem Abdruck in Blendengröße. Bei der Übertragung auf die Blende benutzt er wie BEYERSDORFER (3) eine hülsenartige Halterung, die ein Verrutschen des ausgestanzten Stückes auf der Blende verhindert.

Etwas anders geht LEONHARD (8) vor. Er wählt die zu untersuchende Stelle bereits auf dem Objekt aus und drückt mit Hilfe eines mit dem Mikroskop gekoppelten Prägemechanismus auf diese Stelle ein vorher ausgestanztes zylindrisches Scheibchen Polystrol. Zur Halterung des geprägten Stückes ist auf die Blende ein Netzchen mit einer zentralen Öffnung von der Größe der Stanzstücke aufgeschweißt.

Ein Verfahren mit relativ geringem apparativen Aufwand geben SEIFERT und ECKARDT (11) an. An Stelle der Stanz- bzw. Prägeapparaturen verwenden sie einen gelochten Papierstreifen, der so auf den Abdruck aufgebracht wird, daß die gewünschte Stelle innerhalb des Loches liegt. Ähnlich wie bei den anderen Autoren wird auch hier zur Fixierung des begrenzten Gebietes auf der Blende eine besondere Halterung verwendet.

3. Auf dem Objekt wird vor der Präparation auf die Blende ein bestimmtes Gebiet begrenzt

Das Hauptmerkmal der bisher angeführten Methoden bestand darin, daß die zu untersuchende Stelle auf einem Abdruck des Originalobjektes ausgewählt wurde. Um vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an demselben Objekt durchzuführen, wurden einige andere Methoden entwickelt, bei denen die Markierung bereits auf dem Objekt angebracht wird. Denn es erwies sich als sehr schwierig, die ausgewählten Stellen des Abdrucks auf der Objektoberfläche wiederzufinden, vor allem, wenn es sich um komplizierte und vielgestaltige Strukturen, wie zum Beispiel bei den Zahrhartsubstanzen, handelt. Es sind hierbei die Verfahren von NANKIVELL (10), LENZ (7) und HELMCKE (4) zu erwähnen.

NANKIVELL (10) benutzt zur Markierung einen Vickershärteprüfdiamanten, mit dem er die gewünschte und vorher im Lichtmikroskop bestimmte Stelle des Objektes kreisförmig begrenzt. Der Abdruck, auf dem diese Markierung sichtbar ist, wird unter dem Lichtmikroskop auf die Netzblende gebracht. Dieses Verfahren eignet sich jedoch nur für relativ plane Flächen.

LENZ (7) und HELMCKE (4) benutzen zur Markierung von Zahnbruchflächen einen spitzen Bleistift. Die unter dem Binokular in Form von Drei- oder Vierecken markierten Stellen heben sich im Abdruck durch die anhaftenden Graphitspuren ab. Da beide Autoren zur Stabilisierung der Bedampfungsfolie eine Paraffinschicht auftragen, kann die Präparation auf die Blende nicht unter lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgen. Eine besondere Halterung zur Fixierung des Metallparaffinstückchens auf der Blende während der Auslösung des Paraffins wird nicht angewandt.

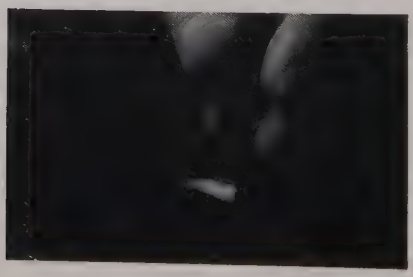
III Material und Präparationstechnik

1. Material

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden gesunde und kariöse Zähne im luftgetrockneten Zustand verwendet. Bei dem in Abschnitt IV, D1 und D2 angegebenen Beispiel handelt es sich um eine Approximalkaries.

2. Allgemeine Präparationstechnik

In der geringen Durchdringungsfähigkeit der Elektronenstrahlen, die zwischen 0,1µ und 1 u liegt, ist der Grund für die unterschiedlichen Präparationsmethoden von Licht- und Elektronenmikroskopie gegeben. Da es technisch unmöglich ist, Dünnschliffe von o,1µ bis 1µ Dicke herzustellen, mußte in der Elektronenmikroskopie von der in der Lichtmikroskopie üblichen direkten Untersuchung des Objektes abgegangen und ein den veränderten Bedingungen des Elektronenmikroskops entsprechendes Verfahren entwickelt werden. Die von WOLF (12) eingeführte Adhäsionsmethode zur Darstellung von Oberflächen wurde von MAHL (9) und KÖNIG (5) für die Elektronenmikroskopie weiterentwickelt. Durch das Aufdampfen eines Metallfilms auf den vom Objekt genommenen Abdruck wird ein sekundäres Positiv des Objektes geschaffen, das im Bereiche der Durchdringungsfähigkeit der Elektronenstrahlen liegt. Das wie folgt beschriebene Abdruckverfahren zur Darstellung von Oberflächen hat sich seit Jahren bewährt und bildet die Basis für die neu entwickelte Methode zur gezielten Präparation.



Der zu untersuchende Zahn wird mit Hammer und Meißel gespalten.

Abb. 1

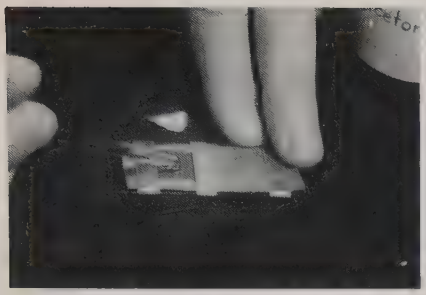


Abb 2

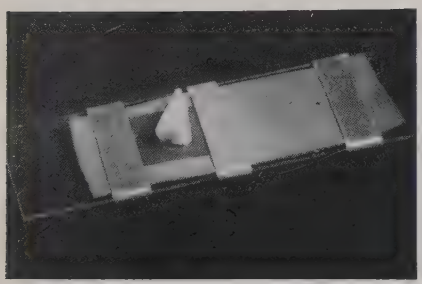


Abb. 3

Abb. 4

Zur Herstellung des Abdrucks spannt man in eine Matrize ein Stückchen Triafolfolie (Cellulose-Acetobutyrat von BAYER) von 0,1 mm Dicke und benetzt es mit einem Tropfen Aceton (Abb. 2). Nachdem die abzudrückende Seite des Zahnbruches ebenfalls mit Aceton befeuchtet worden ist, wird diese mit leichtem Fingerdruck auf die Triafolie aufgedrückt (Abb. 3). Durch das Aceton wird das Triafol gelöst, so daß es zu einem originalgetreuen Abdruck der Bruchfläche kommt. Nach ca. 20 Minuten, nachdem das Lösungsmittel vollkommen verdunstet und das Triafol wieder erhärtet ist, wird der Zahnbruch von der Folie abgenommen (Abb. 4) und in eine Matrize eingespannt (Abb. 5). Im Vakuum von 10^{-3} - 10^{-4} Torr (Abb. 6 zeigt die Vakuumanlage mit eingespannter Matrize) wird der in die Matrize eingespannte Abdruck vorerst im Winkel von 40° 60 Sekunden mit Siliziummonoxyd bedampft, wobei es durch Erhebungen im Abdruck (Vertiefungen im Original) zur unterschiedlichen Bedeckung der Abdruckfolie mit Metall

Abb. 6

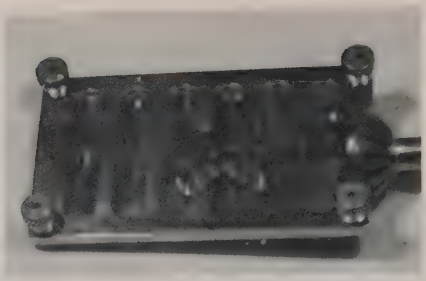


Abb. 5

Abb. 7

kommt. Nach der Schrägbedampfung wird anschließend noch 30 Sekunden senkrecht bedampft. Diese doppelt aufgedampfte Siliziummonoxydschicht stellt das sekundäre Positiv der Bruchfläche dar. Der nun mit einem Metallfilm versehene Triafolabdruck wird mit einer dünnen Paraffinschicht beschickt (Abb. 7) und daraufhin in ein Bad von paraffingesättigtem Methylacetat zur Auflösung des Triafols gelegt (Abb. 8). Nach ungefähr zwei Stunden wird der fast völlig ausgelöste Paraffinabdruck aus dem ersten Bad herausgenommen (Abb. 9) und für weitere zwei Stun-

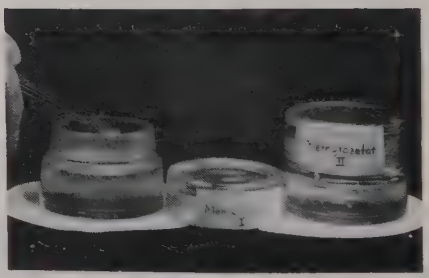


Abb. 8

Abb. 9

Abb. 10

Abb. 11

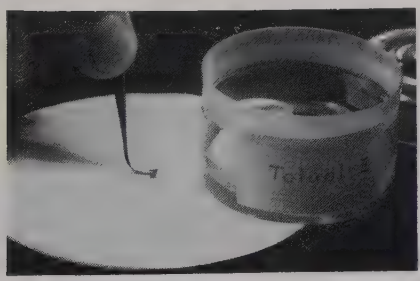


Abb. 12

den in ein zweites Bad gelegt. Bei diesem Auslösungsvorgang ist die vorangegangene Paraffinierung des bedampften Abdrucks von außerordentlicher Wichtigkeit, denn durch die Paraffinschicht wird der Metallfilm vor Rissen und Verzerrungen des auslösenden Triafols bewahrt. Nach einstündigem Trocknen des Metallparaffinabdrucks wird die interessierende Stelle mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und auf die Blende gelegt (Abb. 10). In zwei jeweils einstündigen Toluolbädern (Abb. 11 und 12) wird das Paraffin restlos ausgelöst, so daß nun nur noch der Metallfilm auf der Blende liegt und zur Untersuchung im Elektronenmikroskop gelangt.

IV Ergebnisse

A Allgemeines und Problematik

Bei den Versuchen, ein Verfahren zur gezielten Präparation zu entwickeln, galt es, zwei Hauptvoraussetzungen zu erfüllen, um eine brauchbare Methode zu bekommen:

1. Die Markierung eines unter dem Lichtmikroskop ausgewählten Bezirkes auf dem Objekt oder dem Abdruck.
2. Die genaue Übertragung dieses Gebietes auf die Blende.

Weiterhin hatte ich es mir zur Aufgabe gestellt, ohne Aufwand von apparativen Mitteln auszukommen, um das Verfahren allgemein zugänglich zu machen.

Die Schwierigkeiten dieses Vorhabens mögen daraus hervorgehen, wenn man die Größenverhältnisse bedenkt, mit denen man es bei dem Präparationsverfahren für elektronenmikroskopische Untersuchungen von Abdrücken zu tun hat. Gilt es doch, auf dem Objekt einen nur 950 x 100 µ großen Bezirk auszuwählen und in diese winzige Fläche Markierungen anzubringen, die dann auf dem bedampften Abdruck wiederzuerkennen sein müssen. Anschließend muß dann von der auf den Abdruck aufgedampften etwa 50 bis 100 Å dicken Metallschicht diese markierte Stelle als eigentliches Untersuchungsobjekt genauestens auf die Bohrung der Blende gebracht werden.

B Versuche zur Anbringung einer geeigneten Markierung

Wichtige Hinweise für eine brauchbare und dauerhafte Markierung gaben mir bei Beginn meiner Versuche die Befunde von BERLIN(1). Bei Untersuchungen von Schmelzoberflächen hatte BERLIN feststellen können, daß die mit harten Gegenständen auf dem Schmelz angebrachten mechanischen Verletzungen die normalen Strukturen des Schmelzes auslöschen und sich die veränderten Bezirke als homogene glatte Zonen im elektronenmikroskopischen Bild abheben.

Da die in der Literatur angegebenen Stanzverfahren (BEYERSDORFER, KRAUSE, LEONHARD) einen erheblichen apparativen Aufwand erfordern und die Markierung mit Bleistift (LENZ, HELMCKE) zu ungenau ist, wurde versucht, die Ergebnisse von BERLIN(1) für die Kennzeichnung bestimmter Bereiche auszuwerten.

Es wurde zunächst unter dem Lichtmikroskop eines polierten Schmelzschliffes ein bestimmter Bereich ausgewählt, und es wurden mit einer Stahlspitze zwei Markierungen angebracht. Der Abstand wurde so gewählt, daß die Eindrücke in der Größenordnung des schlitzförmigen Ausschnittes einer Blende, auf die dieses Gebiet übertragen werden sollte, lagen, und betrug etwa 0,8 bis 0,9 mm. Auf einer Reihe von Abdrücken ließen sich die Markierungen immer wieder feststellen. Da aber erfahrungsgemäß die bei lichtmikroskopischer Durchlichtbetrachtung von polierten Schliffen innerhalb des Objektes zu erkennenden

Strukturen auf dem Abdruck, der ja nur die Oberfläche wiedergibt, nicht mehr zu erkennen sind, weil durch die Politur die Oberfläche geglättet ist, wurden die Markierungsversuche auf angeätzte Schliffe ausgedehnt. In diesen sind durch die Anätzung die Schmelzstrukturen aufgeschlossen, so daß ihre elektronenmikroskopische Untersuchung sehr erfolgversprechend ist. Es zeigte sich hierbei, daß durch die Anätzung die Markierung nur noch schwach zu erkennen war. Deshalb wurde die Markierung nach der Anätzung und Auswaschung der Säure erneuert. Da es aber nur selten möglich ist, eine Schlifffläche so zu legen, daß der natürliche Verlauf der Strukturelemente getroffen wird, bevorzugen in der Elektronenmikroskopie viele Autoren die Untersuchung von Bruchflächen. Um eine vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung an demselben Objekt zu ermöglichen, wurde ein Zahnbruchstück einseitig heruntergeschliffen, so daß der fertige Schliff aus einer Schliff- und einer Bruchfläche bestand und an diesem Objekt die Versuche einer Markierung unternommen werden konnten. Auch hier zeigte es sich, daß sich brauchbare Markierungen anbringen lassen.

Um allen Forderungen einer vergleichenden licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung mittels einer gezielten Präparation gerecht zu werden, reichte jedoch die Markierung auf dem Objekt in speziellen Fällen nicht aus. Ist zum Beispiel ein bestimmter Dentinkanal in Längsrichtung darzustellen, so scheitert die Zielpräparation auf dem Schliff oder Bruch. Denn bei der lichtmikroskopischen Betrachtung sind die direkt an der Oberfläche liegenden Strukturen nur äußerst schwierig zu erkennen und von den tieferliegenden Schichten kaum zu trennen. In diesen Fällen läßt sich zwar der gewünschte Bezirk gezielt präparieren, zeigt aber nicht den lichtmikroskopisch eingestellten Dentinkanal, da er im Objekt nur wenige μ unter der Oberfläche lag. Umgehen lassen sich diese Schwierigkeiten damit, daß die Markierungspunkte jetzt nicht mehr auf dem Objekt selbst, sondern auf dem von ihm genommenen Abdruck gesetzt werden.

Die Versuche ergaben, daß eine Markierung möglich ist. Je nach der gestellten Aufgabe ist diese entweder auf dem Objekt oder dem Abdruck anzubringen.

C Versuche zur Übertragung des markierten Gebietes auf die Blende

Nachdem das Problem, ein bestimmtes Gebiet auf dem Objekt oder dem Abdruck zu markieren, gelöst war, mußte ein Weg gefunden werden, diesen Bezirk auf die Blende zu übertragen. Die Hauptschwierigkeit bei diesen Versuchen bot der hauchdünne Metallfilm, der so auf die Blende gebracht werden muß, daß der ausgewählte Bezirk genau den schlitzförmigen Ausschnitt bedeckt. Da eine direkte Übertragung nur mit Hilfe einer Spezialhalterung, wie sie BEYERSDORFER (3), KRAUSE (6) und LEONHARD (8) verwenden, möglich ist, mußte ein anderer Weg gefunden werden, um ohne jegliche Apparatur auszukommen. Eine brauchbare Möglichkeit schien mir die im hiesigen Institut übliche Paraffinierung der Abdrücke zu bieten, denn bei dieser Methode wird der Abdruck nach der Bedampfung auf der Metallschichtseite mit einer dünnen Paraffinschicht überzogen. Dadurch erhält man nach Auslösung der Abdruckfolie an Stelle des hauchdünnen und äußerst empfindlichen Metallfilms zunächst eine Paraffinmetallfilmschicht, die

sich leichter auf die Blende präparieren läßt. Bei den Versuchen zur gezielten Präparation kam es nun darauf an, die Markierung auch auf diese Paraffinmetallschicht zu übertragen und sie genau auf den Blendenschlitz zu bringen und dort zu fixieren. Es wurden deshalb die auf dem Abdruck sichtbaren Markierungen mit einer zahnärztlichen Hakensonde durchstochen. Dadurch wurden die Markierungsstellen auch auf der aufgetragenen Paraffinschicht nach Auslösung der Abdruckfolie sichtbar. Unter dem Binokular wurde nun die Paraffinmetallschicht an diesen Stellen mit einer fein ausgezogenen Glasnadel durchstochen und bei der Präparation auf die Blende so verfahren, daß die Löcher genau innerhalb des Schlitzes zu liegen kamen. Mittels eines leicht erhitzten Wachsmessers, das in die Nähe der belegten Blende gebracht wird, kommt es zur Anschmelzung und damit zur Fixierung des Paraffinmetallstückchens auf der Blende. Es erwies sich im Laufe der Versuche, daß die Durchstechung des Paraffins zu einer Schädigung des Metallfilms führen kann. Daher wurde auf die Durchstechung verzichtet und dafür wurden nur die Türmchen, die sich durch Einfließen des Paraffins in die Löcher des Abdrucks bilden, entfernt. Die markierte Stelle bleibt dadurch ebenfalls gut sichtbar und kann ohne weiteres auf die Blende präpariert werden.

D Endgültiges Verfahren zur Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen

Aus den bei den Versuchen zur Markierung bestimmter Objektbezirke und ihrer Übertragung auf die elektronenmikroskopischen Objektträger gewonnenen Erfahrungen ergab sich ein neues, allgemein anwendbares Verfahren zur gezielten Präparation. Es bietet die Möglichkeit, ohne apparativen Aufwand vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an ein und demselben Objekt durchzuführen. Da die Markierung je nach dem zur Verfügung stehenden Objekt und der Aufgabenstellung teils auf dem Objekt selbst, teils auf dem Abdruck vorgenommen werden muß, ergibt sich folgende Unterteilung. An Hand von Beispielen soll gleichzeitig die Brauchbarkeit und Genauigkeit des Verfahrens bewiesen werden.

1. Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen von lichtmikroskopisch bestimmten Bezirken eines polierten Zahnschliffes

Als Objekt wurde ein polierter Zahnschliff, in dessen Schmelz eine beginnende Karies zu erkennen ist, gewählt. Bei der Betrachtung im Lichtmikroskop hebt sich der Karieskegel klar durch seine Verfärbung vom umgebenden gesunden Schmelz ab. Mittels einer Stahlspitze werden unter dem Binokular zwei Eindrücke auf der Schliffläche gesetzt (Abb. 15). Diese beiden Eindrücke sollen das Gebiet, das auf die elektronenmikroskopische Objektträgerblende präpariert werden soll, begrenzen. Es ist daher darauf zu achten, daß die Distanz zwischen beiden Eindrücken nicht mehr als 950 μ beträgt. Auf dem von der markierten Schliffläche genommenen Abdruck zeichnen sich die mit der Stahlspitze gesetzten Eindrücke einwandfrei ab (Abb. 16). Sie werden nun mit einer zahnärztlichen Hakensonde (Abb. 13) unter dem Binokular durchstochen (Abb. 17). Im Vakuum von 10^{-3} - 10^{-4} Torr (Abb. 6)

wird der so behandelte Abdruck mit Siliziummonoxyd bedampft und anschließend mit einer dünnen Paraffinschicht beschickt (Abb. 7). Der paraffinierte Triafolabdruck wird jetzt im paraffingesättigten Methylacetatbad ausgelöst (Abb. 8 und 9). Nach einstündigem Trocknen kann der Metallparaffinabdruck unter dem Binokular betrachtet werden, wobei die mit der zahnärztlichen Hakensonde durchstochenen Eindrücke des Triafolabdrucks als kleine Türmchen gesehen werden können (Abb. 14). Diese werden dann mit einer Sonde entfernt. Mit einer Rasierklinge wird anschließend die die Markierung enthaltende Stelle in der Größe von etwa 2 x 2 mm ausgeschnitten (Abb. 10). Als elektronenmikroskopische Objektträgerblenden wurden Schlitzblenden mit einer Schlitzlänge von 1000 µ und einer Schlitzbreite von 100 µ verwendet (Abb. 10). Unter dem Binokular wird die Schlitzblende so auf das ausgeschnittene Paraffinstückchen gelegt, daß die beiden Punkte, an denen die Türmchen standen, innerhalb des Schlitzes liegen. Bei durchfallendem Licht heben sich diese beiden Punkte klar von der Umgebung ab. Von der Genauigkeit dieses Arbeitsganges hängt der Erfolg der Präparation ab. Sind die beiden Markierungspunkte einwandfrei im Schlitz zu erkennen, so wird jetzt ein Wachsmesser in der Flamme leicht erhitzt und in die Nähe der belegten Blende gebracht. Sobald man sieht, daß das Paraffin zu schmelzen beginnt, wird das Wachsmesser entfernt. Auch diesen Arbeitsgang verrichtet man am besten unter dem Lichtmikroskop, darauf achtend, daß während des kurzen Anschmelzens keine Verschiebung eintritt. Nachdem das zurechtgeschnittene Metallparaffinstückchen so auf der Blende vorsichtig fixiert worden ist, wird es mit einem Drahtnetzchen beschwert, und im Toluolbad kann nun das Paraffin ausgelöst werden (Abb. 11 und 12). Nach ca. vier Stunden ist der Auslösungsvorgang beendet, die Blende wird kurz trocknen lassen das Netzchen abgehoben, und die Blende ist zur Betrachtung im Elektronenmikroskop bereit.

Wie aus den Abb. 16 und 17 ersichtlich, sind aus dem Bereich des Karieskegels im Gegensatz zur normalen Umgebung viele Kristalle am Abdruck haften geblieben. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der entsprechenden Bezirke erwies es sich nun, daß die Auflagerungen im ersten Abdruck zu stark waren und nicht durchstrahlt werden konnten. Aus diesem Grunde wurden weitere Abdrücke genommen und gezielt präpariert. In diesen Fällen war die Zahl der anhaftenden Kristalle nicht mehr so stark, so daß Aufnahmen gewonnen werden konnten (Abb. 18).

Abb. 13
Hakensonde

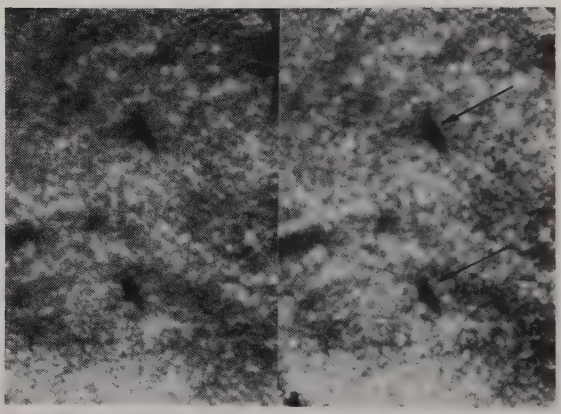


Abb. 14
Metallparaffin-abdruck
Pfeile zeigen auf Türmchen

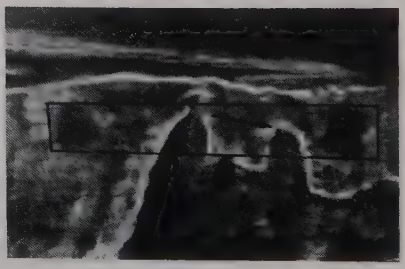


Abb. 15
Polierter Schliff mit Markierungspunkten. Pfeil zeigt auf die zu untersuchende Zacke des Karieskegels

Abb. 16 Abdruck vom polierten Schliff

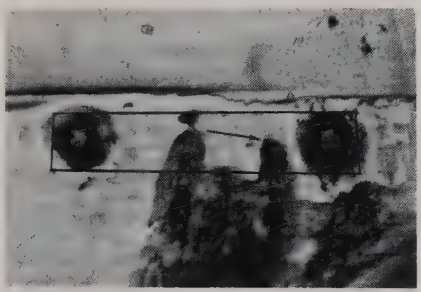


Abb. 17 Markierungspunkte durchstochen

Abb. 18 Kariöser Schmelz, polierter Schliff, Ausschnitt aus Abbildung 15, 840 : 1

Es ist deutlich zu erkennen, daß sich auch auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme der in Abb. 16 eingezeichnete Bezirk durch seine Rauhigkeit abhebt und in diesem Bereich Kristalle aus dem Schmelzgefüge herausgerissen worden sind. Dies stimmt mit den Beobachtungen von HELMCKE überein, der bei beginnender Karies eine Auflockerung des Schmelzgefüges beobachten konnte. Allgemein läßt sich aber sagen, daß elektronenmikroskopische Aufnahmen von polierten Schliffen wenig geeignet sind, um Strukturfeinheiten darzustellen; denn durch das Schleifen und die Politur werden, wie auch aus der Arbeit von BERLIN(1) hervorgeht, die Strukturen größtenteils ausgelöscht. Im vorliegenden Falle hob sich daher nur der kariöse Bereich infolge seiner aufgelockerten Struktur ab. Daß es aber trotzdem möglich ist, von Schliffen brauchbare Informationen zu gewinnen, soll das nächstfolgende Beispiel zeigen, wo derselbe Schliff nach einer Anätzung untersucht wurde.

2. Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen von lichtmikroskopisch bestimmten Bezirken eines angeätzten Zahnschliffes

Der unter IV, D 1 benutzte Zahnschliff wurde fünf Sekunden mit 0,5% HCl angeätzt. Da durch die Anätzung die vorher gesetzten Markierungen nicht mehr so klar auf dem Abdruck zu erkennen waren, wurden sie erneuert und die Präparation in der unter Abschnitt IV, D 1 beschriebenen Weise durchgeführt.

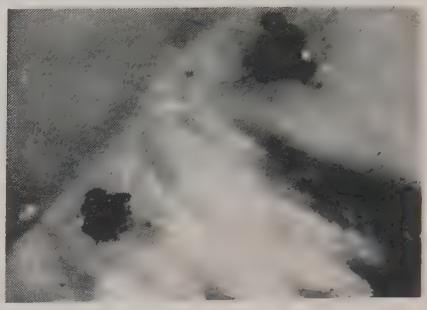


Abb. 19 Angeätzter Schliff mit Markierungspunkten

Bereits die lichtmikroskopischen Aufnahmen vom Abdruck lassen erkennen, daß die Oberfläche des Schliffes auch im nicht kariösen Teil des Schmelzes durch die Anätzung verändert erscheint (Abb. 20 und 21). Die elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme liefert auch die Bestätigung dafür (Abb. 22). Im Gegensatz zu Abb. 18 treten auch im normalen Schmelz die Prismenstrukturen deutlich hervor. Die beiden Zacken des Karieskegels heben sich durch vermehrt anhaftende Kristalle ab (Abb. 22). Vergleicht man die

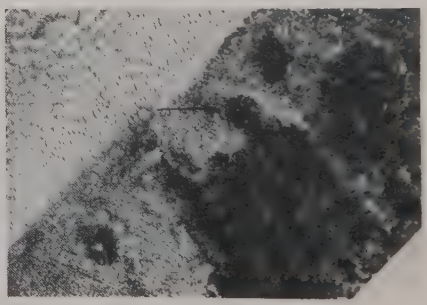


Abb. 20 Abdruck vom angeätzten Schliff, Pfeil zeigt auf die zu untersuchende Zacke des Karieskegels

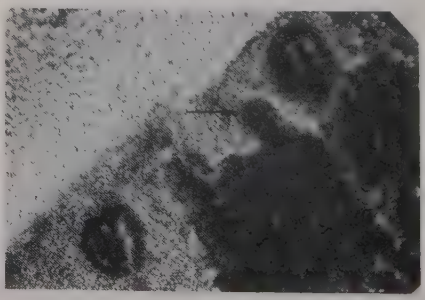


Abb. 21 Markierungspunkte durchstochen

Abb. 22 Angeätzter Schliff mit beiden Zacken des Karieskegels 224 : 1

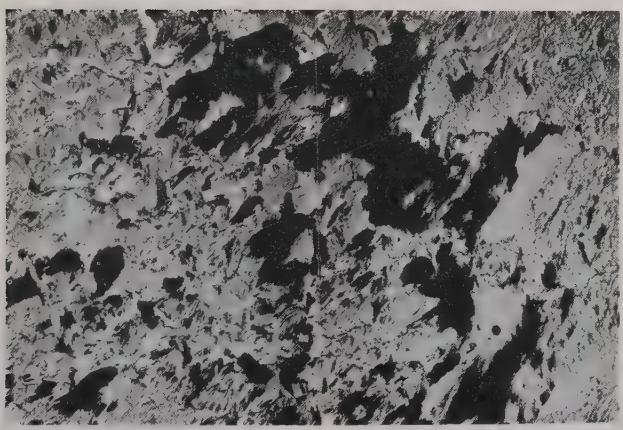


Abb. 23 Angeätzter Schliff, Ausschnitt aus Abb. 22 1120 : 1

Abb. 20 mit 22, so zeigt sich, daß der im lichtmikroskopischen Präparat (Abb. 19) markierte Bezirk sich durch die gezielte Präparation elektronenmikroskopisch mit all seinen sublichtmikroskopischen Strukturen abbilden läßt. Es dürfte also empfehlenswert sein, bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Schliffen diese vorher anzuätzen, um speziell im Schmelz die Strukturen aufzuschließen.

3. Herstellung von gezielten elektronenmikroskopischen Abdruckaufnahmen von lichtmikroskopisch bestimmten Bezirken eines Zahnbruchs

Da sich bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Zahnstrukturen erwiesen hat, daß Abdrücke von Brüchen die besten Ergebnisse liefern, soll auch das gezielte Präparationsverfahren für diesen Fall beschrieben werden. Es empfiehlt sich für vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, den mechanisch aufgebrochenen Zahn so an einer Seite herunterzuschleifen, daß ein Dünnschliff entsteht, der aus einer Bruch- und einer Schlifffläche besteht und im Lichtmikroskop durchstrahlbar ist. Unter dem Binokular wird wie bereits beschrieben die Markierung auf der Bruchfläche angebracht. Als Beispiel wurde die Schmelzdentingrenze gewählt (Abb. 24 und 25). Während sich im lichtmikroskopischen Bild die Schmelzdentingrenze als eine dunkle Linie abhebt und vielfach Anlaß zu Diskussionen gegeben hat, zeigt sich bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme, daß Schmelz und Dentin klar voneinander getrennt sind. An Hand der Bildserie läßt sich genau verfolgen, daß der markierte Bezirk elektronenmikroskopisch wiedergegeben werden kann. Die auf Abb. 24 an der Schmelzdentingrenze erkennbaren schwarzen Linien erweisen sich im elektronenmikroskopischen Bild als Stufen, die durch den Bruch verursacht sind, wie aus den anhaftenden Abdruckfähnchen hervorgeht. Die beiden Stereopaare (Abb. 28 und 29) sollen beweisen, daß es mit Hilfe der gezielten

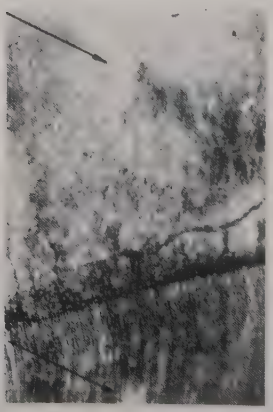


Abb. 24 Schmelzdentingrenze, Bruch, Pfeile zeigen auf Markierungspunkte

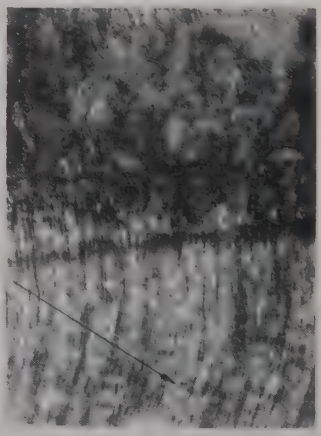


Abb. 25 Schmelzdentingrenze, Bruch, Pfeil zeigt auf einen Markierungspunkt

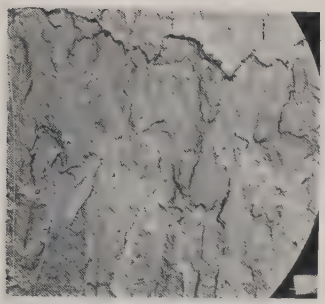


Abb. 26 Schmelzdentin-grenze, Bruch 840 : 1

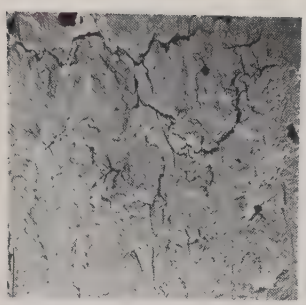


Abb. 27 Schmelzdentin-grenze, Bruch 840 : 1

Abb. 28 Dentinkanalgabelung,

Ausschnitt aus Abb. 26 5040 : 1

Abb. 29 Dentinkanalgabelung,

usschnitt aus Abb. 27 5040 : 1

Präparation möglich ist, denselben Bezirk mehrfach darzustellen, d.h. verschiedene Abdrücke nacheinander zu nehmen und diese gezielt zu präparieren. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, die Qualität und Genauigkeit zu überprüfen, auftretende Artefakte zu erkennen und Fehldeutungen zu vermeiden. Bei flüchtiger Betrachtung der beiden Stereopaare könnte man glauben, es handelt sich um identische Bilder und nicht um die Aufnahmen des zweiten und sechsten Abdrucks. Ein Zeichen, daß durch den Abdruck die Strukturen genauestens wiedergegeben werden. Erst bei genauerer Prüfung läßt sich feststellen, daß z.B. die im Bild links oben sichtbaren Fähnchen abdruckbedingte Artefakte sind.

4. Herstellung gezielter elektronenmikroskopischer Aufnahmen von lichtmikroskopisch ausgewählten Bezirken eines Abdrucks

Wie bereits bei den Versuchen zur Markierung erwähnt, ist es gelegentlich ratsam, die Markierung nicht auf dem Objekt selbst sondern auf dem Abdruck anzubringen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigen die Abb. 30 bis 36.

a) Markierung auf dem vom Zahnbruch genommenen Abdruck

Aufgabe war es, den auf dem Abdruck längs verlaufenden Dentinkanal elektronenmikroskopisch darzustellen. Die Markierung geschieht so, daß der Abdruck vorsichtig an zwei Stellen mit einer zahnärztlichen Hakensonde durchstochen wird. Die Durchstechungspunkte und der Dentinkanal müssen in einer geraden Linie liegen (Abb. 30). Die Übertragung des ausgewählten Bezirkes auf die Blende geschieht in der üblichen Weise. Die Abb. 31 gibt die Lösung dieser Aufgabe überzeugend

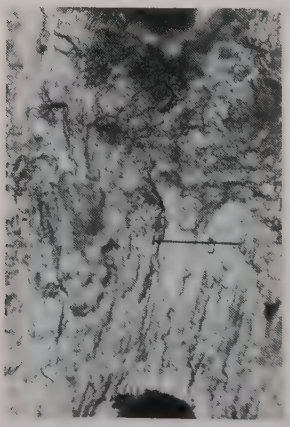


Abb. 30 Abdruck vom Bruch, Dentinkanal in Längsrichtung

Abb. 31 Pfeile zeigen auf Dentinkanal, Bruch, 1120 : 1

wieder. Die bereits in der lichtmikroskopischen Aufnahme als Umrisse sichtbaren Strukturen sind auch auf dem elektronenmikroskopischen Bild zu erkennen. Darüber hinaus treten durch das viel höhere Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops lichtmikroskopisch nicht zu erkennende Einzelheiten deutlich hervor, so daß bei vergleichenden Untersuchungen der ausgewählte Bezirk bis in seine sublichtmikroskopischen Details ausgedeutet werden kann.

b) Markierung auf dem vom Zahnschliff genommenen Abdruck

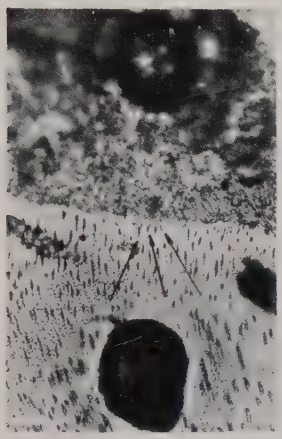


Abb. 32 Abdruck vom angeätzten Schliff, Pfeile zeigen auf drei Dentinkanalgabelungen

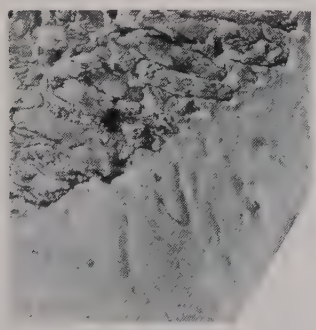


Abb. 33 Angeätzter Schliff, drei Dentinkanalgabelungen, 840 : 1

Die Markierung bestimmter Teile auf Abdrücken von Brüchen stößt häufig dadurch auf Schwierigkeiten, daß diese Abdrücke sehr viel Strukturfeinheiten wiedergeben (was allerdings für elektronenmikroskopische Untersuchungen von Vorteil sein kann) und eine genaue Einstellung im Lichtmikroskop oft nicht möglich ist. Darum kann es bei bestimmten Aufgabenstellungen besser sein, wenn man die Abdrücke polierter oder angeätzter Schliffe verwendet. Auch hierfür soll ein Beispiel gebracht werden. Von einem angeätzten Schliff galt es, die unmittelbar an der Schmelzdentingrenze liegenden drei verzweigten Dentinkanalendungen darzustellen. Da im Lichtmikroskop bei der Betrachtung des Schliffes nicht zu entscheiden war, ob diese Teile tatsächlich an der Oberfläche lagen, wurde die Markierung auf dem Abdruck gewählt (Abb. (Abb. 32). Die Aufnahmen 33 bis 36 zeigen die ausgewählten Dentinkanäle nach der Zielpräparation. Zum Präparat ist zu bemerken,

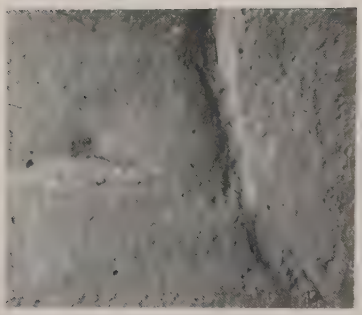


Abb. 34 Dentinkanalgabelung,
Ausschnitt aus Abb. 33
5040 : 1

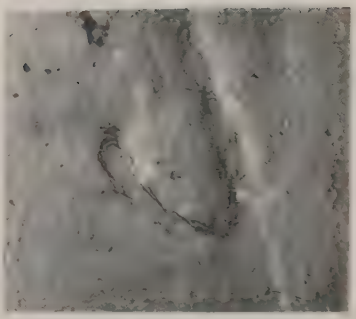


Abb. 35 Dentinkanalgabelung,
Ausschnitt aus Abb. 33
5040 : 1

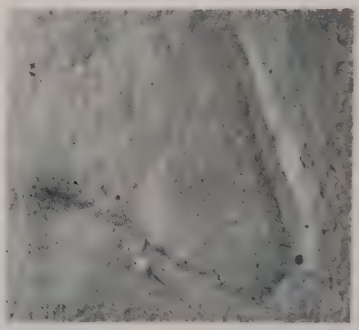


Abb. 36 Dentinkanalgabelung,
Ausschnitt aus Abb. 33
5040 : 1

daß durch die Anätzung zwar die Schmelzstrukturen aufgeschlossen wurden, aber das Dentin relativ strukturlos erscheint und nur die angeschliffenen Dentinkanäle hervortreten.

Wie aus den angeführten Beispielen hervorgeht, ist eine vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von zahnhistologischen Präparaten mit Hilfe der gezielten Präparationsmethode möglich. Welche Art der Markierung, d.h. auf dem Objekt selbst oder auf dem Abdruck, angewendet wird, richtet sich nach der Aufgabenstellung und dem Ziel der Untersuchung.

Die Untersuchungen wurden mit Elektronenmikroskopen vom Typ ÜM 100 b und Elmiskop II nach E. RUSKA und B. von BORRIES der Firma SIEMENS & HALSKE AG in der "Forschungsgruppe für Mikromorphologie in dem FRITZ-HABER-INSTITUT" durchgeführt.

V Diskussion

Betrachtet man die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Zielpräparation, so ist festzustellen, daß keines allen in der Zahnhistologie auftretenden Fragestellungen gerecht wird, ganz abgesehen davon, daß zur Erreichung des Zieles eine mehr oder weniger komplizierte Apparatur erforderlich ist, die keineswegs in jedem Institut vorhanden sein dürfte.

Das Stanzverfahren zur Gewinnung bestimmter Bezirke, wie es von BEYERSDORFER (3), KRAUSE (6) u.a. angegeben wird, hat zweifellos in Bezug auf die Genauigkeit der ausgewählten Stellen und deren Übertragung auf die Blenden gewisse Vorteile. Nachteilig ist, wie bereits erwähnt, der apparative Aufwand.

Der von NANKIVELL (10) beschrittene Weg zur Markierung eines bestimmten Gebietes auf dem Objekt selbst mittels eines Vickers-Härteprüfdiamanten erscheint mir als äußerst zweckmäßig, da die angebrachte Markierung auf beliebig vielen Abdrücken zu erkennen ist. Diese Art der Markierung ist aber nur anwendbar bei relativ planen Flächen und scheitert bei der in der Elektronenmikroskopie beliebten Untersuchung von Zahnbruchflächen.

Bei der von LENZ (7) angegebenen Methode ist nachteilig, daß nicht ein engumgrenzter Bezirk auf die Blende gebracht wird und ein Spielraum von ca. 1 mm besteht.

Ebenso wie bei LENZ (7) findet auch bei HELMCKE (4) die Übertragung des auf dem Objekt markierten Gebietes auf die Netzblende nicht unter lichtmikroskopischer Kontrolle statt. Durch die Verwendung von Netzblenden wird zwar der Bildausschnitt wesentlich vergrößert, das Auffinden der gewünschten Stelle im Elektronenmikroskop aber erschwert. Außerdem können je nach Zufall durch die Balken des Netzes die interessierenden Strukturen verdeckt werden.

Die neue Methode zur Zielpräparation ist speziell für Schlitzblenden entwickelt worden, um dem in der Zahnhistologie gehegten Wunsche, möglichst größere Gebiete im Elektronenmikroskop darzustellen, zu entsprechen. Um ein allgemein zugängliches Verfahren aufzustellen, ist bei der Entwicklung dieser Methode bewußt auf jegliche Hilfsapparatur verzichtet worden.

Die von LENZ (7) und HELMCKE (4) angewandte Methode, die bedampfte Abdruckfolie mit einer dünnen Paraffinschicht zu beschicken, wurde aus zwei Gründen übernommen. Die Paraffinschicht gibt beim Auslösen des Triafolabdruckfilmes dem hauchdünnen Metallfilm einen Halt und schützt ihn vor Verzerrungen. Weiterhin läßt sich die auf dem Objekt bzw. dem Abdruck angebrachte Markierung durch die Lochung des Abdruckes gut auf das Paraffin übertragen und gestattet damit eine Präparation und Fixierung des begrenzten Bezirkes unter lichtmikroskopischer Kontrolle auf die Blenden.

Mit den bisher üblichen Präparationsmethoden konnten, wie aus der Literatur hervorgeht, weitgehende Einblicke in die sublichtmikroskopischen Strukturen der Zahnhartsubstanzen gewonnen werden. Sie gestatten aber nicht eine direkte vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung engumgrenzter Bezirke ein und desselben Objektes, was zur Folge hatte, daß teilweise die elektronenmikroskopischen Ergebnisse von seiten der Lichtmikroskopiker umstritten waren.

Die neu entwickelte Methode zur gezielten Präparation schlägt eine Brücke zwischen Licht- und Elektronenmikroskopie und ermöglicht direkte Vergleiche der mit beiden Verfahren gewonnenen Ergebnisse. Durch die Herstellung beliebig vieler Abdrücke und ihrer gezielten Aufbringung auf die Blenden lassen sich identische Stellen immer wieder elektronenmikroskopisch abbilden. Dadurch ist auch die Möglichkeit gegeben, die Genauigkeit und Qualität der Abdrücke zu überprüfen, Artefakte zu erkennen und die Deutung der Bilder zu erleichtern. Betrachtet man von diesem Gesichtspunkt aus die bisherigen elektronenmikroskopischen Ergebnisse, die zum Teil erheblich in der Deutung voneinander abweichen, so lassen sich in Zukunft bei Anwendung der gezielten Präparation sicher viele der noch bestehenden Differenzen vermeiden.

Die mehrfache Darstellung derselben Stellen ist auch dazu geeignet, im Elektronenmikroskop Veränderungen durch chemische und mechanische Einwirkungen im sublichtmikroskopischen Bereich zu erforschen. Mit den bisherigen Methoden war dies nicht möglich. Die Ergebnisse dürften eine wertvolle Ergänzung zu den bisherigen lichtmikroskopischen Untersuchungen auf diesem Gebiet bilden. Es sei hier auf die Arbeiten über Oberflächenresistenz, Remineralisation der Schmelzoberfläche sowie Schutzwirkung durch Fluor hingewiesen.

VI Zusammenfassung

Es wurde eine neue Methode zur gezielten Präparation von Abdrükken entwickelt, die es gestattet, ohne apparativen Aufwand vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an demselben Objekt durchzuführen. Die Methode besteht darin, daß je nach der Aufgabenstellung entweder auf dem Objekt selbst oder auf dem Abdruck die zu untersuchende Stelle lichtmikroskopisch bestimmt und markiert wird. Durch Übertragung der Markierungspunkte auf den mit Paraffin beschickten Bedampfungsfilm des Abdrucks lassen sich die ausgewählten Objektbezirke unter lichtmikroskopischer Kontrolle so genau auf die Bohrung der Blenden präparieren und dort fixieren, daß sie elektronenmikroskopisch abgebildet werden können. Die durch dies Vèrfahren gegebene Möglichkeit, Objektteile mehrfach situationsgleich darstellen zu können, bietet den Vorteil, auftretende Artefakte zu erkennen und bei der Deutung auszuschließen. Weiterhin lassen sich durch diese Methode auch Untersuchungen im elektronenmikroskopischen Bereich über chemische und mechanische Einwirkungen an Oberflächen durchführen und die Veränderungen auch im sublichtmikroskopischen Bereich sichtbar machen.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. Hermann Mathis, möchte ich meinen ergebenen Dank für die Überlassung des Themas und für seine stets freundliche Unterstützung aussprechen.

Herrn Prof. Dr. phil. habil. J.-G. Helmcke danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Entwicklung der Methode in der von ihm geleiteten Forschungsgruppe für Mikromorphologie.

Dem wissenschaftlichen Assistenten der Forschungsgruppe für Mikromorphologie, Herrn Dr. Hans Lenz, danke ich besonders herlich für seinen wertvollen Rat und die anregenden Hinweise, die zur Vervollkommnung der Methode führten.

Weiterhin möchte ich Frl. I. Willrodt für die saubere photographische Arbeit danken.

VII Literaturverzeichnis

1. BERLIN, V.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen mechanischer und chemischer Verletzungen des Schmelzes
Vortrag, 6. ORCA-Kongreß 1959

2. BETHGE, H.: Verfahren und Anordnung zur Herstellung von Abdruckaufnahmen lichtmikroskopisch bestimmter Objektbereiche
Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik, Band 62, Heft 2, 1954

3. BEYERSDORFER, K.: Methoden und Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Abbildung von Glasoberflächen
Glas- und Hochvakuum-Technik, 1, 1952

4. HELMCKE. J.-G.: Betrachtungen über neue elektronenmikroskopische Ergebnisse
Vortrag, 5. ORCA-Kongreß 1958

5. KÖNIG, H.: Ein elektronenmikroskopisches Abdruckverfahren für biologische Objekte
Gött. Nachr. Math. Phys, Kl. 1946

6. KRAUSE, R.: Eine Methode, die die Auswahl und Präparation eines bestimmten Bezirkes für elektronenmikroskopische Untersuchungen im Lichtmikroskop ermöglicht
Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik, Band 63, 1956/58

7. LENZ, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Strukturen des normalen Dentins und deren Veränderung durch Karieseinwirkung
Zahnmed. Dissertation, FU Berlin, 1955

8. LEONHARD, F.: Ein Verfahren zur thermoplastischen Zielpräparation
Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik, Band 62, 1954/55

9. MAHL, H.: Über das plastische Abdruckverfahren zur übermikroskopischen Untersuchung von Oberflächen
Zeitschrift für techn. Physik, 22.Jahrg. 1941

10. NANKIVELL, J.F.: A method of observing selected areas in electron and optical microscopes
Brit. J. Appl. Physics, 4, 1953

11. SEIFERT, L. und ECKARDT, A.: Eine einfache Methode zur Präparation lichtmikroskopisch ausgewählter Objektstellen für übermikroskopische Untersuchungen
Physikalische Verhandlungen, 6, Seite 15/16, 1955

12. WOLF, J.: Über die Herstellung mikroskopischer Präparate der Oberflächen verschiedener Objekte mit Hilfe der Adhäsionsmethoden
Z. wis. Mikrosk. 56, 181-201 (1939)

Lebenslauf

Am 18. Juli 1932 wurde ich als dritter Sohn des Reichsbahnsekretärs Arno Möckel und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Gläsel in Siebenbrunn Vogtl. geboren. Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Volksschulen in Weischlitz Vogtl. und Reichenbach Vogtl.; von 1943 bis 1951 die Oberschule zu Reichenbach Vogtl., wo ich 1951 mein Abitur ablegte. Am 1. September 1951 immatrikulierte ich mich an der Humboldt Universität Berlin für das Studienfach Zahnheilkunde. Im Jahre 1952 bestand ich das Vorphysikum. Im April 1954 immatrikulierte ich mich an der Freien Universität Berlin und legte 1955 die Zahnärztliche Vorprüfung und am 9. Januar 1958 die Zahnärztliche Prüfung ab. Seit November 1958 bin ich in der Forschungsgruppe für Mikromorphologie in der Max - Planck - Gesellschaft als Doktorand tätig.